

2005. ÉVI SZAKMAI ZÁRÓJELENTÉS

I. Bevezető

A zárójelentés Dr. Huszár Tamás „A renin-angiotenzin szerepe a csontátépülés szabályozásában” című OTKA pályázatának eredményeit taglaljuk. A zárójelentésben ismertetésre kerülnek az OTKA pályázathoz kötődő munka megvalósításához rendelkezésre állt személyi- és laboratóriumi feltételek, a munkaterv megvalósítása, a kutatómunka eredményeinek rövid összefoglalása valamint az eredmények publikációja.

II. Elméleti háttér

Az utóbbi évtized kutatásai jelentős eredményeket értek el a sebgyógyulás, a szöveti fibrózis és a szöveti remodelling folyamatának megismerésében. Több fiziológiás és kóros folyamatban igazolódott a szöveti renin-angiotenzin rendszer (RAS) szerepe. A szisztémás RAS-hoz hasonlóan a szöveti RAS effektor molekulája is az angiotenzin II peptid, amely hatására további biológiailag aktív anyagok kerülnek szekrécióra, mint a transforming growth factor (TGF)- β . A szöveti remodelling képét a biológiailag aktív vegyületek együttes hatása határozza meg, így fokozódik a kötőszöveti sejtek proliferációja és az extracelluláris mátrix szintézise. Jelen ismereteink szerint bár a RAS–TGF- β tengely tagjai jelen vannak a csontszövetben, nincsenek adatok arra nézve, hogy ez a szabályzó részt vesz-e a csontszövet átépülésében.

Kísérleteinkkel a csontosodás, az osteogen differenciálódás folyamatát, illetve annak humorális szabályozását vizsgáljuk. Elsősorban a RAS–TGF- β tengely celluláris szintű hatásait mérjük. Hipotézisünk szerint a csontban a szöveti RAS aktiválódása, illetve a következményes TGF- β termelődés serkenti a csontszövet remodellingjét, és az osteogen markerek megjelenését.

Eredményeink haszna kettős, a fiziológiai folyamat részleteinek megismerése mellett esetleges klinikai alkalmazásra is lehetőséget ad. Erre példa a szájsebészeti beavatkozásoknál felhasznált, a csontregenerációt fokozó terápiás beavatkozás, a thrombocytában gazdag plazma (PRP) alkalmazása csontdefektusok feltöltésénél.

III. Személyi és laboratóriumi feltételek

A kísérletek kivitelezéséhez szükséges sejtbiológiai laboratóriumi feltételek rendelkezésre álltak a Semmelweis Egyetem Kórélettani Intézetében, Prof. Dr. Rosivall László nephrológiai munkacsoportjához tartozó laboratóriumban. A laboratóriumban megtalálható berendezésekre alapozva sikeresen állítottunk be új mérési módszereket:

- osteoblast differenciálási technikák
- fluoreszcens mikroszkópia
- osteoblast sejtvonalra optimalizált tranziens transzfekció

–in vitro sejtenyészetek alkalikus foszfatáz aktivitásának mérése (Ezek részletezését lásd alább)

A munka elvégzésében részt vevő kutatócsoport összetétele megegyezik a pályázatban közölt kutatókkal. (A kutatók névsorát és munkaidejüknek a projektre fordított százalékát lásd az 1. táblázatban.)

1. táblázat

	Név	Beosztás	Arány
1.	Dr. Huszár Tamás PhD	Vezető	40%
2.	Dr. Terebessy Tamás		30%
3.	Dr. Fintha Attila		10%
4.	Dr. Masszi András		40%

Emellett bizonyos specializált laboratóriumi feltételeket és szaktudást igénylő módszerek esetében kooperációs segítséget kaptunk: A radioaktívan jelölt ligand kötési méréseket Dr. Hunyady László és munkacsoportja (Semmelweis Egyetem Élettani Intézet) az elektromikroszkópos vizsgálatok Semmelweis Egyetem II. Kórbonctani Intézet laboratóriumában végezték.

IV. Tudományos eredmények

1. A csontsejtek proliferációjának vizsgálata

Mind az angiotenzin II (Ang II), mind a TGF- β számos mesenchymalis sejttípusnál fokozza a proliferációt. Annak igazolására, hogy ez a jelenség osteoblastokon is mérhető, mértük az MC3T3-E1 osteoblast sejtvonal proliferációs válaszait. Ehhez egy non-radioaktív proliferációs technikát, az MTT reakciót alkalmaztuk. Pozitív kontrollként a sejteket epidermal growth factorral (EGF) vagy szérummal stimuláltuk, és a kísérleti körülményeket ez alapján normalizáltuk. Az előbbi két anyaghoz hasonlóan a TGF- β stimulálta az MC3T3-E1 sejtek proliferációját (2.a. táblázat). Érdekes megfigyelést tettünk az Ang II hatásait mérve: Szérumos közegben tartott sejteket kezelve Ang II-vel nem mértünk proliferáció változást a kontrollhoz viszonyítva. Viszont ha a sejteket 24 órás szérummegvonás után kezeltük Ang II-vel, akkor szignifikáns csökkenést kaptunk. (2.b. táblázat)

2.a. táblázat

Kezelési idő	kontroll	TGF- β	EGF	10% FBS
24 óra	1	1,424 \pm 0,243	1,280 \pm 0,067	0,979 \pm 0,38
48 óra	1	1,775 \pm 0,055	1,486 \pm 0,058	2,11 \pm 0,33
72 óra	1	1,785 \pm 0,241	1,596 \pm 0,047	1,875 \pm 0,34

2.b. táblázat

Kezelési idő	kontroll	10-7M AngII (24ó szérummegvonás)	10-7M AngII (szérumos közeg)
24 óra	1	0,639±0,18	1,037±0,21
48 óra	1	0,836±0,21	0,970±0,16
72 óra	1	0,657±0,1	1,062±0,12

2. Extracellular regulated kinase (ERK) aktivációja

Korábbi kísérleteinkben az ERK proliferációt fokozó hatását mértük több sejttípusban. Ezek alapján az MTT méréssel nyert adatainkat az ERK aktivációjának mérésével próbáltuk megerősíteni. Ehhez Western blotot, és foszfospecifikus anti-p-ERK antitestet használtunk, amely szelektíven ismeri fel a kináz aktív formáját. Pozitív kontrollként EGF-t és PMA-t használtunk. A TGF- β az ERK gyors és masszív aktivációját okozta. Viszont az Ang II több különböző dózisban és inkubációs idő után sem aktiválta a kinázt. További kísérleteinkben tervezzük a szérummegvonás hatásának vizsgálatát a fenti válaszra. Tervezzük, hogy vizsgáljuk az Ang II hatását az EGF és a TGF- β stimulálta aktivációra.

3. Angiotenzin receptor detektálás radioaktív ligand kötési méréssel

A sejtfelszíni receptor populáció mérésének az egyik lehetséges megközelítése a radioaktív izotóppal jelzett ligand kötésének detektálása. Ehhez [125 I-Sar¹, Ile⁸]angiotenzin II kötést használtunk. A méréseket Dr. Hunyady László laboratóriumában, kooperációban végeztük. Pozitív kontrollként AT1 típusú angiotenzin receptorral stabilan transzfektált epithelialis sejteket (LLC-PK1/AT1) használtunk. Jelenleg a módszer beállítását elvégeztük. Előzetes kísérleteink alapján szérumos médiumban inkubált MC3T3-E1 osteoblastok nem mutatnak angiotenzin kötést.

Ismert, hogy az Ang II két fő sejtfelszíni receptora (az AT1 és az AT2) közül az AT2 több sejttípuson gátolja a proliferációt. Viszont az AT2 expressziója nem konstans, hanem a sejt stresszre adott válaszában a része. További kísérletekkel követni próbáljuk, hogy a szérummegvonás hogyan befolyásolja az angiotenzin receptor expressziót az osteoblastokon. Feltételezésünk szerint az osteoblast sejteken az angiotenzin receptor expresszióját fokozza a szérummegvonás, azaz a sejtstressz in vitro modellje.

4. Nuclear factor- κ B (NF- κ B) aktiváció detektálása

Az Ang II kiváltotta kettős proliferációs válasz természete alapján a következő modellt állítottuk fel: Ismert, hogy az AT2 receptorok az embrionális szövetre jellemzőek, érett szövetekben alacsony szintű az expressziójuk és proliferációt csökkentő hatása van. Feltételezésünk szerint a szérummegvonás az NF- κ B útvonal aktivációját váltja ki, és az AT2 gén promoterében található NF- κ B responzív elemeken keresztül fokozza az AT2 angiotenzin receptor expresszióját. Ehhez

dokumentálni kívántuk az NF- κ B p65 alegységének sejtmagbeli transzlokációját. Ehhez anti-p65 antitestet és fluoreszcens immuncitokémiát alkalmaztunk.

Az immuncitokémia technika egyes lépéseinek (sejttenyésztési lépések, fixálás, mikroszkóp beállítások) beállításához egy közvetlenül jelölt festékkel, rhodaminnal jelzett falloidin festékkel citoskeleton festést készítettünk. Ezzel a technikával detektáltuk továbbá a TGF- β stresszrost összeépülést indukáló hatását is az MC3T3-E1 sejteken.

Előzetes eredményeink szerint a szérummegvonás nem vált ki p65 transzlokációt a sejtekben, ami ellene szólna a feltevésünknek. Jelenleg További kísérletekben tervezzük az AT2 receptor expressziójának mRNS szintű mérését. Ehhez jelenleg végezzük a reverz transzkriptáz-PCR technika beállítását. Továbbá tervezzük az AT2 gén promoterének aktivitásának mérését tranziens transzfekciós módszerrel.

5. β -catenin/TCF/LEF jelátviteli út szerepe a TGF- β kiváltotta proliferációs válaszban

Epithelialis sejtekben az adherens junkciót alkotó E-cadherin intracelluláris oldalához az α -, β - és γ -cateninekből álló komplex kapcsolódik. Nyugvó sejtben ha a β -catenin felszabadul az adherens junkcióból, a szabad molekula ubikvitinálódik és lebomlik a proteoszómában. Az ubikvitinációs lépés szabályozott, ehhez a glikogén szintáz kináz 3 (GSK3) aktivációja szükséges. Azonban, ha a lebomlást serkentő szignál gátolt, a β -catenin a sejtmagba transzlokálódik, és a T-cell factor/Lymphocyte enhancer factor (TCF/LEF) nevű transzkripciós faktorokon keresztül speciális DNS régiókhoz kapcsolódva szabályozza bizonyos gének expresszióját.

Az utóbbi időben ismerték fel, hogy a csontérési folyamatokban a β -catenin részt vesz a genetika válaszok szabályozásában. Korábbi munkáink során kimutattuk, hogy TGF- β hatására epithelialis sejtekben a β -catenin fehérje a sejtmag körül, illetve a sejtmagban akkumulálódik, illetve a β -catenin dependens génexpresszió fokozódik. Feltételeztük, hogy a TGF- β osteoblastokban is aktiválja a β -catenin/TCF/LEF jelátviteli utat, és ez részt vesz a proliferációs válasz kialakításában.

Ehhez mérni kívántuk, hogy a β -catenin út aktiválása hogyan befolyásolja az osteoblastok proliferációját. A β -catenin lebomlását a GSK3 inhibitor, litium klorid alkalmazásával gátoltuk, majd mértük a proliferációs választ. A kontroll sejteket LiCl helyett azonos koncentrációjú NaCl-dal kezeltük. Eredményeink szerint a LiCl nem befolyásolja ugyan az MC3T3-E1 sejtek osztódását, de a TGF- β indukálta választ csökkenti 3. táblázat.

3. táblázat

Kezelés:	kontroll	TGF- β	LiCl	LiCl+TGF- β
	1	1,44 \pm 0,16	1	1,14 \pm 0,22

6. TGF- β és Ang II hatása a sejtproliferáció aktivációjában szerepet játszó ún. „immediate-early gene” expressziójára osteoblastokban

Ehhez a kísérlethez a riporter-promoter plazmidok tranziens transzfekciójának, valamint a riporter enzimek aktivitás mérésének módszerét kellett beállítani. E módszer során a vizsgálni kívánt gén promoterét és egy riporter gént tartalmazó plazmid mellett egy belső kontrollként szolgáló konstans aktivitású riporter plazmid transzfektáljuk a sejtekbe. Technikai nehézséget jelentett az a probléma, hogy a kontroll plazmid reagálhat a kezelésre, így a normalizálás során torzíthatja a jelet. Az elsőként kipróbált rendszer (pRL-TK kontroll plazmid) esetében ütköztünk abba a problémába, hogy a TGF- β fokozta a kontroll plazmid aktivitását. További két rendszer kipróbálása után a pTK- β plazmid és a β -galaktozidáz aktivitás luminometriás módszerrel való mérése vezetett eredményre.

Tranziens transzfekciós módszerrel c-fos promótert (-732 - -44 bp szakasza) transzfektáltunk tranziensen MC3T3 osteoblastokba (Fugene) majd 16 órás Ang II vagy TGF- β kezelést követően mértük a c-fos expressziót jelző luciferáz aktivitást. Az eredményeket a pTK- β plazmid aktivitására normalizáltuk.

Eredményeink szerint az Ang II nem változtatta meg a c-fos expressziót, míg a TGF- β kezelés több mint kétszeres aktivitásfokozódáshoz vezetett, ami a TGF- β proliferációt fokozó szerepére utal MC3T3 osteoblast sejtekben (4. táblázat).

További terveink szerint a β -catenin és az NF- κ B útvonal aktivációját mesterséges, csak ezekre a jelátviteli utakra érzékeny riporter-promoter plazmidok tranziens transzfekciójával tervezzük mérni.

4. táblázat

Kezelés:	kontroll	TGF- β	Ang II
Relatív aktivitás	1	2,17 \pm 0,18	0,84 \pm 0,21

7. TGF- β és Ang II hatása az osteoblastok differenciálódására

A csontéresi markerként használt alkalikus foszfatáz aktivitás mérés beállítása 2005-ben megtörtént. (Roche Reflotron) Három hét előnövesztést követően MC3T3 sejtek sejtlyázumából mértük az alkalikus foszfatáz aktivitást különböző idejű illetve különböző koncentrációjú Ang II vagy TGF- β kezelés után, valamint vizsgáltuk a litium-klorid előkezelés hatását a TGF- β kezelés hatására kialakult differenciálódási változásokra. A kezelések során a sejteket alacsony szérumszintű médiumban tenyésztettük.

5. táblázat

Kezelés:	kontroll	TGF- β	LiCl	LiCl+TGF- β
Relatív aktivitás	1	0,53 \pm 0,15	0,19 \pm 0,26	0,13 \pm 0,10

TGF- β kezelés hatására csökkent a sejtek ALP aktivitása, ami a TGF- β differenciálódást gátló hatására utal. Az Ang II kezelés nem befolyásolta a sejtek ALP aktivitását (5. táblázat) Ezt a hatást meglepő módon a LiCl nem védte ki, sőt kismértékben potencírozta. A TGF- β dózis- és időgörbe vizsgálat azt mutatta, hogy az általunk vizsgált legkisebb dózis esetén (0,04 ng/ μ l) esetén már szignifikáns hatás mérhető.

8. További eredmények

I) A fenti kísérletekkel párhuzamosan folytattuk a 2003. évi beszámolóban jelentett a fogászati implantátumok felületi morfológiájának osteoblast és fibroblast sejtek aktivitására és proliferációjára kifejtett hatásának vizsgálatát. A kísérlet részleteit az előző évi jelentésben leírtuk, 2004-ben az előzetes kísérletek eredményeit megerősítettük, és több előadás valamint a Fogorvosi Szemlében cikk jelent meg a kísérletek eredményeiből.

II) A lokális renin-angiotenzin rendszerek- illetve azok intracelluláris jelátviteli folyamatainak vizsgálatát vesetubulus- (LLCPK) illetve hörcsög ovarium sejteken kezdtük és a továbbiakban csont sejteken kívánjuk folytatni. Kimutattuk, hogy az Ang II paradox módon képes a renin promóter transzkripciójának aktiválására és ezen aktivációban az intracelluláris tirozin kinázok és a JNK kaskád szerepet játszik. A fenti eredmények 2004-ben megjelentek a Nephrology Dialysis and Transplantation tudományos lapban. A kísérletek befejezése részben az ifjúsági OTKA támogatásával történt.

III) A TGF- β által aktivált intracelluláris jelátviteli rendszereket vizsgáltuk epithelialis sejteken. Megállapításaink szerint a TGF- β kezelés fibroblast irányú differenciálódást, fokozott mátrix szintézist és fokozott motilitást indukál LLC-PK sejtekben. A fenti válaszokban a β -catenin/TCF/LEF jelátviteli rendszer alapvető szerepet játszik. Eredményeinket 2004-ben publikáltuk az American Journal of Pathology tudományos lapban.

V. Az elvégzett kísérletek publikációs hatása

Eredményeink részben publikáltak (lásd alábbi lista). Emellett a fent leírt eredményeket még további közleményekben tervezzük publikálni. Terveink szerint külön eredeti közleményben jelentjük meg az Ang II valamint a TGF- β osteogen hatásainak publikálását.

Eredeti közlemények:

1) Joób FÁ, Huszár T, Divinyi T, Rosivall L, Szabó Gy: A titán-implantátumok felületi mikromorfológiájának hatása a fibro- és oszteoblaszt sejtek proliferációs aktivitására

Fogorv. Sz. 2004;97(6):251-55

2) Terebessy T, Masszi A, Fintha A, Sebe A, Huszar T, Rosivall L, Mucsi I.: Angiotensin II activates the human renin promoter in an in vitro model: the role of c-Jun-N-terminal kinase. *Nephrol Dial Transplant. 2004 Sep;19(9):2184-91.*

3) Masszi A, Fan L, Rosivall L, McCulloch CA, Rotstein OD, Mucsi I, Kapus A.: Integrity of cell-cell contacts is a critical regulator of TGF-beta 1-induced epithelial-to-myofibroblast transition: role for beta-catenin. *Am J Pathol. 2004 Dec;165(6):1955-67.*

Kongressusi szereplések:

1) Dr. Joób-Fancsaly Árpád, Dr. Huszár Tamás, Prof. Dr. Divinyi Tamás: A fogászati implantátumok felület morfológiájának szerepe a fibroblaszt sejtek proliferációs aktivitásában.

Magyar Fogorvosok Fogpótlástani Társasága XV., Magyar Fogorvosok Implantológiai Társasága V., Magyar Paradontológiai Társaság XIII. Kongresszusa 2003 Budapest (előadás)

2) Huszár Tamás, Joób-Fancsaly Árpád, Divinyi Tamás: A titán implantátumok felületi kezelésének hatása a fibroblaszt sejtek proliferációs aktivitására

Magyar Arc-, Állcsont- és Szájsebészeti Társaság VII. Kongresszusa 2003, Pécs (előadás)

3) T Huszár, Á Joób Fancsaly, T. Divinyi: Role of surface morphology of dental implants in the fibro- and osteoblast proliferation

Magyar Arc-, Állcsont- és Szájsebészeti Társaság VIII. Kongresszusa, V. Nemzetközi Danubius Kongresszus 2004 Április 29-Május 1. (előadás)

4) Huszár Tamás, Bogdán Sándor, Fülöp Gábor, Szabó György, Barabás József:

A különböző csontpótlási módszerek élettani háttere. (A vérlemezke dúsított plazma (PRP) szerepe a csontpótlás hatékonyságának fokozásában

Magyar Plasztikai Helyreállító és Sebész Társaság Kongresszusa, 2004, Nyíregyháza; Szeptember 30.-Október 2. (előadás)

5) Joób F.Á., Divinyi T., Huszár T.: Az implantátumok felületi morfológiájának szerepe a fibro- és oszteoblasztok proliferációjában

MAFIT Jubileumi Tudományos Konferenciája, 2004, Budapest,.10.02

6) Joób AF, Huszár T, Divinyi T, Rosivall L: The effect of surface micromorphology of titanium dental implants on the proliferation activity of fibroblasts and osteoblasts

Kongress der Österreichischen Gesellschaft für Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie 2005 Februar 1-5. Salzburg (előadás)

7) Huszár T, Adamkó S, Masszi A, Bodor CS, Bogdán S, Rosivall L: A TGF- β hatása az MC3T3-e1 osteoblast sejtek proliferációjára és differenciálódására
Magyar Élettani Társaság Vándorgyűlése 2005. június 2-4, Budapest (poszter)

Budapest, 2006. február 24.

Huszár Tamás

Témavezető